

A PAC1 receptor izoformák expressziós arányának meghatározása és a PAC1 receptor immunreaktív struktúrák azonosítása fejlődő patkány retinában

Készítette: CZOTTER NIKOLETTA
Biológus MSc hallgató
II. évfolyam

Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék
Témavezető: Dr. Dénes Viktória és Prof. Dr. Gábel Róbert



Pécs, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

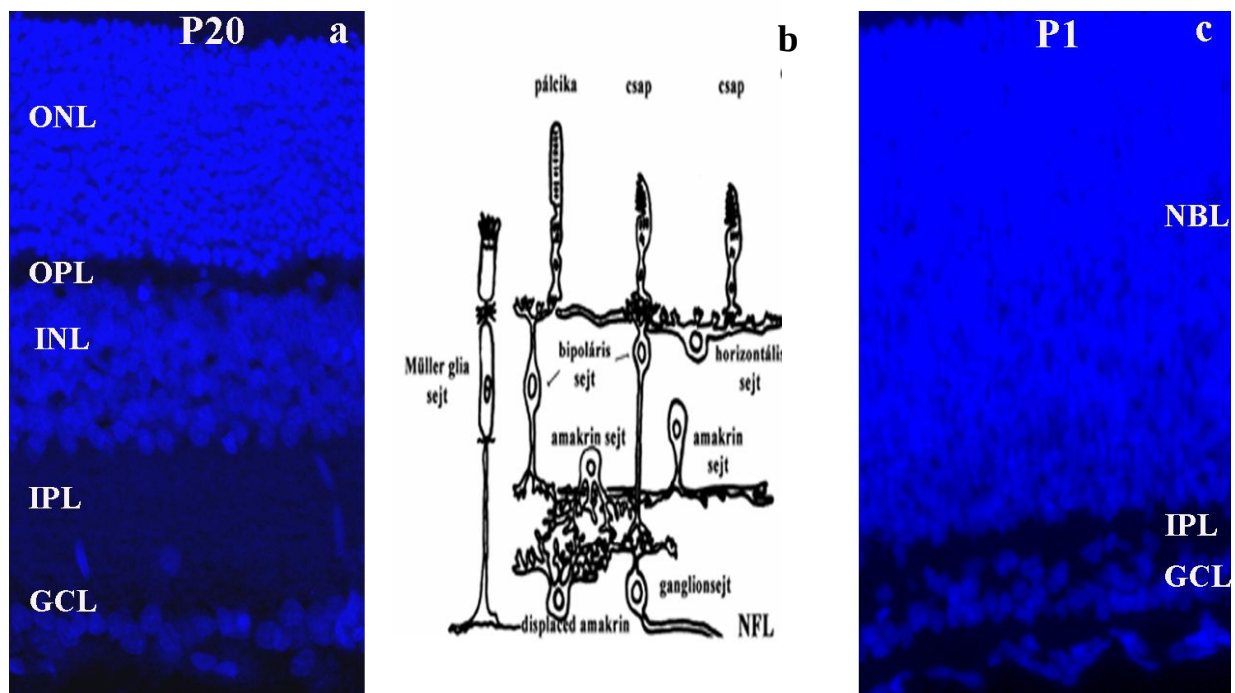
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1. Az emlős retina felépítése és fejlődése.....	3
1.2. A hipofízis adenilát- cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)	5
1.2.1. A PACAP előfordulása az emlős szervezetben.....	6
1.2.2. A PACAP legfontosabb funkciói az idegrendszerben.....	6
1.3. PACAP receptorok és előfordulásuk a szervezetben	7
1.3.1. A PACAP receptorokhoz kapcsolódó szignálútvonalak	8
1.4. PACAP receptorok előfordulása és szerepe a retinában	9
1.4.1. PACAP receptorok és izoformái a retinában.....	9
2. CÉLKITŰZÉSEK	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	12
3.1. Kísérleti állatok és szövet preparálás	12
3.2. Génexpressziós vizsgálatok.....	12
3.3. Immunhisztokéimiai vizsgálatok.....	15
4. EREDMÉNYEK.....	17
4.1. Hip és Hop1 receptorok expressziójának változásai	17
4.1.1. A Hip és Hop1 receptor izoformák expressziójának változása a retina fejlődése során	17
4.1.2. A Hip és Hop1 izoformák egymáshoz viszonyított kifejeződésének vizsgálata	18
4.2. PAC1-R immunreaktív struktúrák azonosítása	20
4.2.1. <i>PAC1 immunreaktív struktúrák kimutatása a retinában</i>	20
4.2.2. Kettős jelölés PAC1 immunpozitív sejttípus azonosításra	23
5.1. Izoforma-váltás lezajlása.....	25
5.2. PAC1-R eloszlás időbeli jellegzetességei, valamint összehasonlítása egyéb neurokémiai eredményekkel	26
5.3. A Hop1 és Hip receptorok mögött álló szignál transzdukciós útvonalak.....	28
6. ÖSSZEFOGLALÁS	30
7. IRODALMI HIVÁTKOZÁSOK	31
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	35

1. Bevezető

1.1. Az emlős retina felépítése és fejlődése

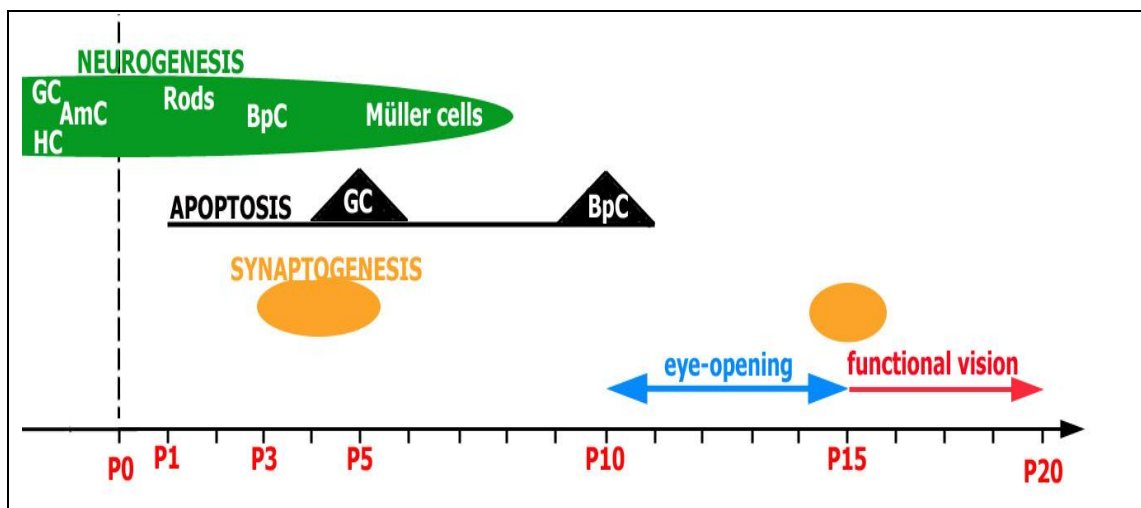
A retina, azaz a szem ideghártyája, több egymástól jól elkülöníthető rétegből és az egyes rétegeket alkotó specifikus sejtekből felépülő szövettípus. Jól szervezett struktúrájának eredménye, hogy a fényinformáció felfogása után képes azt elektromos jellé alakítani.

A gerincesek retinája a következő rétegekből és sejtekből épül fel (1/a-b ábra): pigmenthám rétege (PE), fotoreceptor sejtek rétege (PL), amelyet a csapok és pálcikák sejtjeinek külső szegmense alkot, a külső határmembrán (OLM), külső sejtés réteg (ONL), mely a csapok és pálcikák sejttestjeit tartalmazza, külső rostos réteg (OPL), belső sejtés réteg (INL): a horizontális, bipoláris és amakrin sejtek és Müller sejtek rétege, belső rostos réteg (IPL), ganglionsejtek rétege (GCL), amely a ganglion sejtek sejttestjeit tartalmazza és az optikus rostok rétege (NFL) (1. ábra).



1. ábra: Felnőtt és újszülött patkány retina felépítésének összehasonlítása: a-P20 napos retina szerkezeti rétegei, b-P20 napos retina sejt típusai, c-P1 korú retina rétegei.

A retina sejtjeinek képződése az embrionális fejlődés során indul meg multipotens progenitor sejtekből, amelyek a retina neuroblaszt rétegében (NBL) lokalizálódnak (1/c ábra). A fejlődés megindulása során ezek a sejtek elkötelezetté válnak különböző sejtípusok felé és kilépnek a sejtciklusból. A NBL rétegben a késői prenatalis és korai posztnatalis (P) időszakban már megfigyelhető a fejlődő GCL réteg, benne a fejlődés során legelsőként megjelenő ganglion sejtekkel (GC) (6. ábra). Ugyanebben az időszakban láthatóvá válik már a NBL- ben a differenciálódó INL rétege, ami a kifejlett retinában az amakrin (AmC)-, bipoláris (BpC)-, horizontális (HC) és Müller glia sejteket tartalmazza. A HC és AC sejtek neurogenezise már a prenatalis időszak végén megkezdődik, míg a BpC és Müller sejtek érése a posztnatalis fejlődés korai szakaszára esik (2. ábra). A sejtek közötti szinaptogenezis patkány retinában a P3. és 5. napja közötti periódusra tehető, míg a szemnyitás időszaka P10-15 nap közötti időszakra esik. Ez az időszak azért lényeges, mert a retinában a szemnyitás előtt ún. permisszív mikrokörnyezet uralkodik, lehetővé téve, ezáltal a neuronok fejlődését és a szinaptogenezist. Mindebből következik, hogy a szemnyitódás előtt már valamennyi sejtípus kifejlődik a retinában (PERRY és mtsai., 1983; WEBSTER és ROWE, 1991; REESE és COLELLO, 1992 ; SASSOE-POGNETTO ÉS WASSLE, 1997; JOHANSSON és mtsai., 2000, JOHNSON és mtsai., 2003; RAPOPORT és mtsai., 2004; MORROW és mtsai., 2008).



2. ábra: A patkány retina posztnatalis fejlődésének eseményei

1.2. A hipofízis adenilát- cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (PACAP) birka hipotalamuszból izolálták először, azon tulajdonsága alapján, mely szerint a peptid erősen képes stimulálni az adenilát-cikláz aktivitását (AC) (MIYATA & mtsai., 1989). A peptid a szervezetben két biológiailag aktív formában fordul elő, az egyik a 38 aminosavból álló PACAP38, mely a szervezetben megtalálható PACAP mennyiség 90 %-át teszi ki. A peptid másik formája a szervezetben jelentősen kisebb arányban előforduló, 27 aminosavat tartalmazó PACAP27 (VINCZE & KÖVES 2001). A PACAP szerkezete alapján a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) szuperfamilia tagja (VAUDRY és mtsai., 2000). Az evolúció során való megjelenése alapján ezen család legjobban konzerválódott tagját képviseli A PACAP N-terminális végének első 27 aminosava, amely a biológiai aktivitást kölcsönzi a peptidnek, a különböző gerinces fajokban teljes mértékben megőrződött, míg a C-terminális vége nagyobb mértékű variabilitást mutat (VAUDRY és mtsai., 2009) (3. ábra).

Human, Cattle, Sheep, Pig, Mouse, Rat, Guinea pig	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK	100 %
Chicken	-I-----	97 %
Lizard	-----	100 %
Frog	-----I--	97%
Lungfish	-----K--	97%
Goldfish-a	-----R--	97%
Goldfish-b	-----R-I--	95%
Salmon	-----R-YR--	92 %
Catfish	-----R-R-FR--	89 %
Stargazer, Flounder, Halibut	-----Q--R-R--R--	89 %
Whitefish, Grayling	-----R-YRS-	89%
Sturgeon	-----E--R--R--	92%
Stingray	-----PK-R-SGRRVFY	89 %
Tunicate 1	-----N-----	96 % with PACAP27
Tunicate 2	-----N-----IN-L-	85 % with PACAP27

3. ábra: A PACAP aminosav szekvenciája különböző fajokban. Human=ember, Cattle=marha, Sheep=juh, Pig=sertés, Mouse=egér, Rat=patkány, Guinea pig=tengeri malac, Chicken=csirke, Lizard=gyík, Frog=béka, Lungfish=tüdőshal, Goldfish=aranyhal, Salmon=lazac, Catfish=harcsa, Stargazer=csillagvizsgálóhal, Flounder=lepényhal, Halibut=lepényhal, Whitefish=maréna, Grayling=pér, Sturgeon=tokhal, Stingray=rája, Tunicate=zsákállat. VAUDRY és mtsai., 2009.

1.2.1. A PACAP előfordulása az emlős szervezetben

A PACAP előfordulása és funkciója alapján az ún. „brain-gut” peptidek közé sorolható, ami azt jelenti, hogy a központi és perifériás idegrendszeren kívül, nem idegi struktúrákban is előfordul (VINCZE és KÖVES, 2001).

A PACAP a központi idegrendszeren belül, legnagyobb mennyiségben a hipotalamuszban mutatható ki, de PACAP immunreaktív sejtek találhatók számos más idegrendszeri struktúrában, így a septumban, a hippocampusban, az amygdalában, a thalamusban, a cerebrális cortexben és a cerebellumban is (VAUDRY és mtsai., 2000). A perifériás idegrendszerben PACAP jelenlétét mutatták ki az elsődleges érző neuronokban, valamint a vegetatív prae- és posztganglionáris neuronokban (VINCZE és KÖVES, 2001).

A peptid a perifériális szervek közül a herében fordul elő legnagyobb mennyiségben (VAUDRY és mtsai., 2000), de PACAP immunreaktív rostok detektálhatóak a gasztrointestinális rendszerben (ARIMURA és mtsai., 1991), a reproduktív szervek simaizomzatában (FAHRENKRUG és mtsai., 1996), a pancreas exocrin és endocrin részében, valamint a parenchymás szervekben (szív, tüdő, máj, vesék) (VINCZE és KÖVES, 2001). PACAP jelenléte figyelhető meg a szem íriszének sphincter izomzatában, a ciliáris ganglionban és a retina ganglionsejt rétegében (GCL) (VAUDRY és mtsai., 2000).

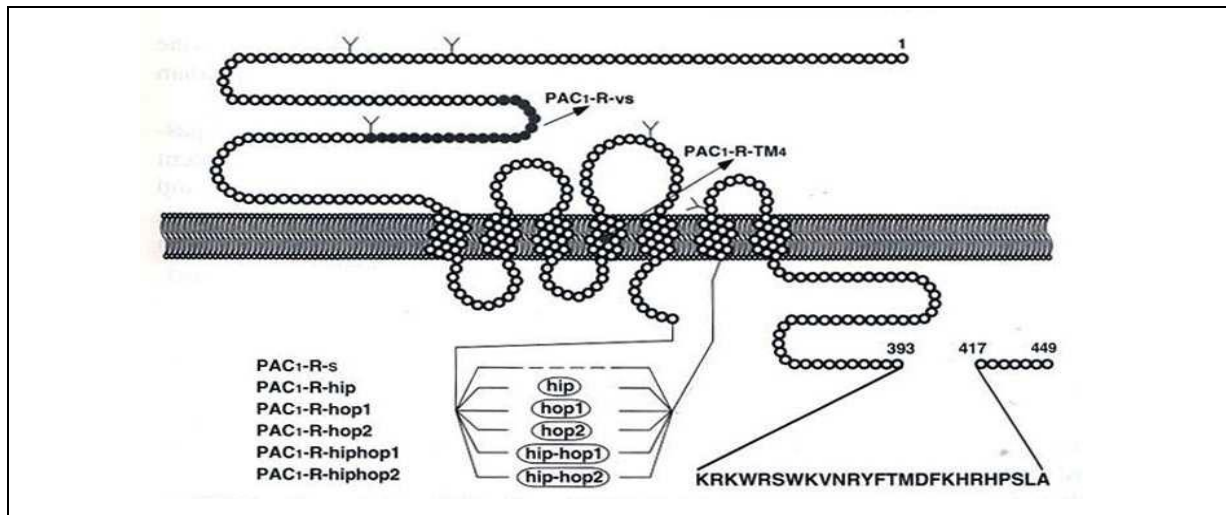
1.2.2. A PACAP legfontosabb funkciói az idegrendszerben

A PACAP egy rendkívül széles spektrumú biológiai hatásokkal rendelkező pleiotropikus peptid, mely neurotranszmitterként, neuromodulátorként és neurohormonként is ismert. A peptid számos funkciójához tartozik többek között, hogy számos sejt osztódását képes stimulálni (asztrocita sejtek, neuroblaszt sejtek). Ugyanakkor a PACAP nem csak stimulálni, hanem gátolni is képes a sejtek proliferációját (SHERWOOD és mtsai., 2000). Számos kísérletben bizonyították, hogy a PACAP-nak jelentős szerepe van az idegrendszer, valamint egyéb szervek fejlődésében, így vizsgálták jelenlétét és hatásait a központi idegrendszerben, szemben és a májban is (SHERWOOD és mtsai., 2000). A PACAP ezek mellett neurotrofikus hatással is bír, (VAUDRY és mtsai., 2000), valamint számottevő vazodilatációt okozó cardiovasculáris hatással is rendelkezik. A PACAP idegrendszerre gyakorolt hatásai közül fontos megemlíteni a melatonin termelés szabályozása révén a napi biológiai ritmus szabályozásában betöltött szerepét, valamint olyan magatartási formák irányítását, mint a táplálékfelvétel és a szomjúságérzet (VAUDRY és mtsai., 2000).

A PACAP egyik legfontosabb sejt szintű hatása - amelynek felfedezését is köszönheti -, hogy direkt módon képes stimulálni az AC működését, nagymértékű ciklikus-adenozil-monofoszfát (cAMP) akkumulációt okozva az idegsejtekben. Ezen tulajdonsága alapján a PACAP jelentős szerepet tölt be az apoptotikus folyamatok szabályozásában. Ezen funkciójának köszönhetően ez a sokoldalú peptid megvédi a neuronokat a különböző citotoxikus hatásokkal szemben, mint például a glutamát és NMDA indukálta excitotoxicitás, etanol, ischémia, valamint anisomycin kiváltotta sejthalál esetén (KWONG és LAM 2000; VAUDRY és mtsai., 2000; DOHI és mtsai., 2002; SILVEIRA és mtsai., 2002, TAMÁS és mtsai., 2004).

1.3. PACAP receptorok és előfordulásuk a szervezetben

A PACAP sokrétű hatását specifikus membránreceptorokon keresztül közvetíti a szervezetben. Szerkezetüket tekintve ezek a PACAP receptorok 7 transzmembrán doménnel és egy intracelluláris G-protein kötő karral rendelkeznek. Jelenlegi ismereteink szerint a PACAP receptorainak három típusa fordul elő a szervezetben: PAC1, VPAC1 és VPAC2. Ezeket a receptorokat két osztályba sorolják, PACAP-hoz és VIP-hez való affinitásuk alapján (VAUDRY és mtsai., 2000). Az első típusba tartozó PAC1 receptor PACAP specifikus, mivel sokkal nagyobb affinitást mutat a PACAP-hoz, mint a vele rokon VIP peptidhez. A másik típusba a VPAC1 és VPAC2 receptorok tartoznak, amelyek hasonló affinitással kötik a két peptidet (ARIMURA 1998; VAUDRY és mtsai., 2000). A PAC1 receptornak eddig hat izoformáját (Null, Hip, Hop1, Hop2, HipHop1, HipHop2) azonosították az emlős szervezetben (DICKSON és mtsai., 2009). Ezek a receptor variánsok alternatív splicing útján jönnek létre, melyek egy vagy kettő, 28 (Hip, Hop1, HipHop1) vagy 27 aminosavat tartalmazó (Hop2, HipHop2) kazettának a harmadik intracelluláris hurokba történő beépülése révén alakulnak ki. A Null izoforma nem tartalmaz inszerciót (4. ábra).

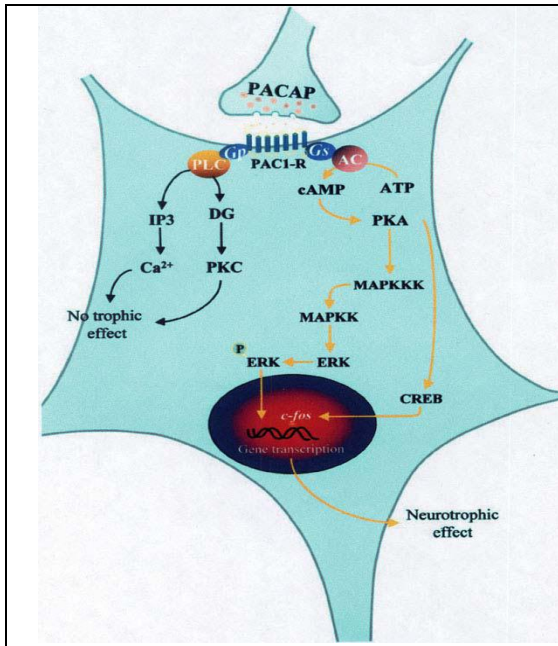


4. ábra: PAC1 receptor izoformák szerkezete (ARIMURA, 1998)

A különböző PAC1 receptorok elsősorban az agy különböző területein, a gerincvelőben, az adenohipofízisben, a hipotalamikus területeken, a mellékvesevelőben és az endokrin mirigyekben mutathatók ki. A VPAC1 és VPAC2 receptorok kisebb arányban képviseltetik magukat a szervezetben és eloszlásuk is behatároltabb, mint a PAC1 receptoroké (VAUDRY és mtsai., 2000). Az emlős retinában mind a három receptor típust mRNS és fehérje szinten is kimutatták (BAGNOLI és mtsai., 2003), de olyan tanulmányokat, melyek a receptorok retinális ontogenezis során zajló expressziós változásairól szolgáltatnak adatokat, nem találunk.

1.3.1. A PACAP receptorokhoz kapcsolódó szignálútvonalak

A PAC1 receptorhoz kapcsolódó szignáltranszdukciós útvonal egyike a cAMP/PKA/MAP-kináz reakció út, mely során a PAC1 receptor aktiválódása stimulálja a cAMP termelődését. A cAMP elsődleges célpontja a protein-kináz A (PKA), amely a CREB (cAMP-függő DNS válaszelemet kötő fehérje) fehérjét képes foszforilálni. A CREB a jelet a sejtmagba továbbítva, a c-fos gén expresszióját eredményezi (VAUDRY és mtsai., 2000) (5. ábra). A PAC1 receptorhoz kapcsolódó másik lehetséges út a foszfolipáz-C (PLC) enzimhez köthető kaszkád. A PLC enzim aktiválódása a plazmamembránban található foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát hidrolízisét eredményezi. A keletkező két termék, az inozitol (1,4,5)-triszfoszfát (IP3) és a diacilglicerol (DAG) hatására létrejön a Ca^{2+} -szignál, illetve aktiválódik a protein-kináz C enzim, amely fontos szerepet játszik a biológiai válasz elindításában (HOLIGHAUS és mtsai., 2011) (5. ábra).



5. ábra: PACAP receptorhoz kapcsolódó intracelluláris mechanizmusok (VAUDRY és mtsai.,

A PACAP sokrétű hatásai, tehát, a sejtek membrájában lévő különböző PACAP receptorok és az általuk közvetített eltérő szignálútvonalak következménye. A Null, Hop1 és Hop2 izoformák, mind az AC, mind a PLC aktiválását eredményezi, míg a Hip kizárólag az AC útvonalat stimulálja (HOLIGHAUS és mtsai., 2011).

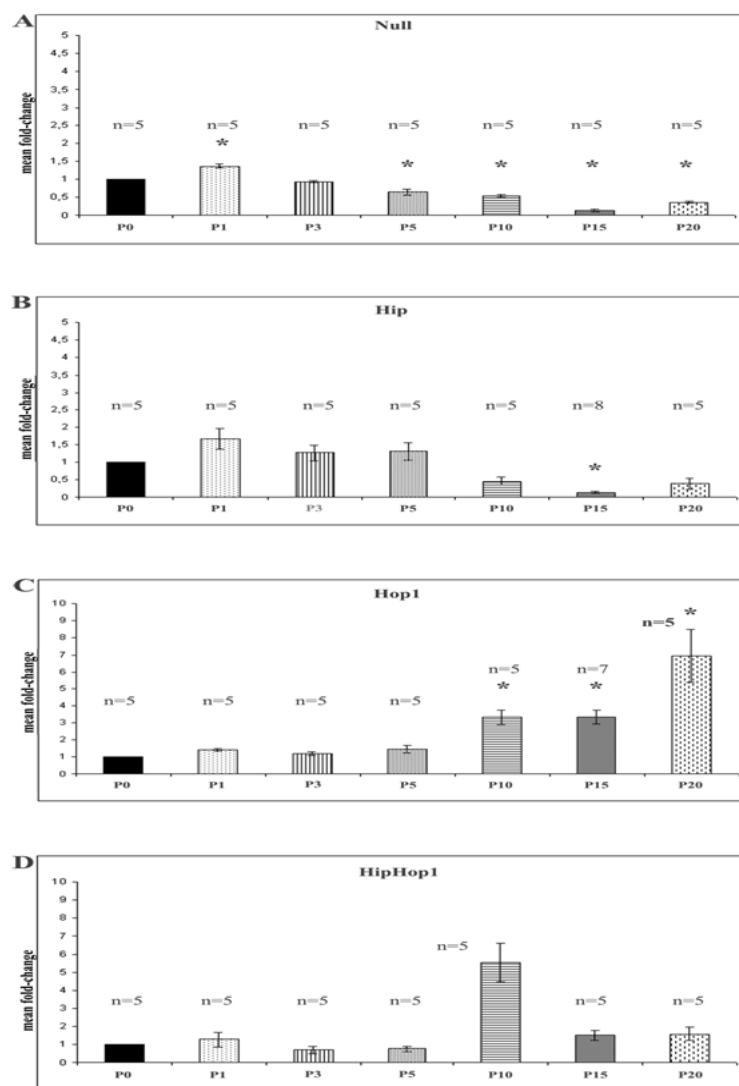
1.4. PACAP receptorok előfordulása és szerepe a retinában

1.4.1. PACAP receptorok és izoformái a retinában

Habár a PACAP receptorok és izoformáik jelenlétét néhány tanulmányban leírták már felnőtt emlős retinában (D'AGATA és mtsai., 1997; NJAINE és mtsai., 2010), addig ezen receptorok kifejeződésének vizsgálata a retina fejlődése során egy sokkal kevésbé kutatott terület.

Kutatócsoportunk egy korábbi munkája során sikeresen azonosította fejlődő patkány retinában a PAC1 receptorok 4 izoformáját: Hop1, Hip, Null, HipHop1, amelyek expressziója nagymértékű változást mutat a retina fejlődése során (LAKK és mtsai., 2012) (6. ábra). Az eredmények azt bizonyítják, hogy a posztnatális fejlődés korai szakaszában (P0-P1), a Hip receptor izoforma expressziója a jellemző egészen az ötödik napig, majd expressziója folyamatosan csökken P20-ig. A Null izoforma expressziója hasonló mintázatot követ. Ezzel ellentétben a Hop1 receptor szintje fokozatos emelkedést mutat a fejlődő patkány retinában, aminek eredményeképpen a P10. naptól kezdődően a Hop1 válik a domináns receptor izoformává a szövetben (LAKK és mtsai., 2012).

Ezen adatok azt engedik feltételezni, hogy egy Hip-Hop1 receptor izoforma váltás játszódik le az P5.-10. nap között a posztnatális fejlődés során, amelynek meghatározó szerepe lehet a PACAP által mediált hatásokra.



6. ábra: PAC1 receptor izoformák expressziós mintázatának változása fejlődő patkány retinában (LAKK és mtsai., 2012)

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján feltételeztük, hogy egy Hip/Hop1 receptor izoforma váltás játszódik le az 5.-10. nap között a retina posztnatális fejlődése során (LAKK és mtsai., 2012). Ezen adatokat alapul véve, célkitűzéseinket az alábbi pontokban határoztuk meg:

1. Kvantitatív real-time PCR segítségével meghatározzuk a Hip és Hop1 receptor izoformák expressziós változásait, valamint az izoforma váltás dinamikáját és pontos idejét az 5. és 10. nap között fejlődő patkány retinában.
2. Az immuncitokémia eszközeivel azonosítsuk a PAC1 receptort kifejező struktúrákat, valamint, hogy megvizsgáljuk, változnak-e ezen struktúrák a retina vizsgált fejlődési periódusában.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok és szövet preparálás

Vizsgálataink elvégzéséhez 5, 6, 7, 8, 9 és 10 napos albínó Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat 22 °C -os állandó hőmérsékleten tartottuk, valamint 12 órás megvilágítást és ad libitum etetést biztosítottunk számukra. Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottság protokolljának megfelelően történt a vizsgálat során.

Az adott napokon az egyes állatokon ugyanabban az órában végeztük el a retinák illetve az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a szemserleg eltávolítását.

3.2. Génexpressziós vizsgálatok

- 1) **RNS kivonás:** A retinák homogenizálását, majd a homogenizátumból az RNS kivonását és tisztítását QIAshredder és RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) segítségével a protokollban megadottak szerint végeztük el. A kapott totál RNS szuszpenziókat -80 °C -on tároltuk felhasználásig.
- 2) **RNS koncentráció meghatározása:** A minták RNS koncentrációjának meghatározását spektrofotométerrel végeztük, ahol az egyes minták optikai denzitását 260 nm-en mértük.
- 3) **Reverz transzkripció:** A 2µg totál RNS tartalmú mintákból oligodT primer (Thermo Scientific) és RevertAid Hminus RT enzim (Thermo Scientific) segítségével cDNS-t állítottunk elő az alábbi program szerint (1. táblázat).

1. lépés	2. lépés	3. lépés	4. lépés	5. lépés
65 °C	25 °C	37 °C	50 °C	80 °C
5 perc	10 perc	10 perc	20 perc	3 perc

1. táblázat: Reverz transzkripció programja

- 4) **Quantitatív Real-Time PCR (Q-PCR):** A Hip és Hop1 receptor izoformák expressziós mintázatának meghatározásához kétféle módszert alkalmaztunk.

a) SybrGreen módszer: A 20 µl végtérfogatú PCR reakció 3 µl cDNS-t, 10 µl 2x SYBR Green PCR Master Mix-et (Thermo Scientific) 5 µM forward primer-t (2. táblázat) és 5 µM reverz primer-t (2. táblázat) és RN-áz mentes desztillált vizet tartalmazott. Normalizációs kontrollként RPL13 primerpárt használtunk. Minden mintához 3 párhuzamosan futtatott reakciót (triplikátumot) állítottunk be. A különböző korú mintákat minden esetben a 0. napon mért értékhez viszonyítottuk. A reakciók futtatásához Step One Plus (Applied Biosystems) készüléket használtunk. A Q-PCR reakció során a 3. táblázatban feltüntetett hőmérséklet,- és idő paramétereket alkalmaztuk.

Primer	Forward primer	Reverz primer
Hip	GCATTCACCCCCTTTCCTACG	CCTCCCCATTCAGGAAGCAG
Hop1	CGAGTCCAGCATCTACTTCAGC	CACAAGTCTTTCCTCTTGCTGACG
Hop-Taql	CAT GGG AGG CAA CGA GT	CACAAGTCTTTCCTCTTGCTGACG
Hop1 próba	5'-56-FAM-CTACTTCAGCTGCGTGCAGAAATGCTAC-31ABkFQ-3'	
Hip próba	5'-56-TAMNTTTCCTACGGCTGGCCCGCTCCAC-31ABkFQ-3'	
RPL13	CTCATGAGGTCGGGTGGAAGTA	TGGGTTACACCAAGAGTCC

2. táblázat: Alkalmazott primerek és próbák szekvenciái

Ismétlés	Fázis	Hőmérséklet	Időtartam
1x	Denaturáció	95 °C	10 perc
40x	Denaturáció	94 °C	15 ms
40x	Annelláció	59 °C	20 ms
40x	Elongáció	72 °C	20 ms

3. táblázat: Q-PCR reakció programja a SybrGreen módszerhez

b) Taqman módszer: Az általunk összeállított 20 µl végtérfogatú reakcióelegy tartalmazott 10 µl 2x Fast Taqman Mix-et (Applied Biosystem), 5 µM forward primer-t, 5 µM reverz primer-t, primer specifikus próbákat (szekvencia 2. táblázat) 3 µl cDNS-t és RN-áz mentes vizet. A reakciót a 4. táblázatban feltüntetett programon futattuk meg.

Ismétlés	Fázis	Hőmérséklet	Időtartam
1x	Denaturáció	95 °C	1 perc
50x	Denaturáció	95 °C	10 ms
50x	Annelláció	56 °C	20 ms
1x	Elongáció	62 °C	20 ms

4. táblázat: Taqman PCR reakció programja

6) Adatok kiértékelése, statisztika: A PCR reakciók kinetikai görbéinek kiértékelését Step One Plus Software 2.2.2. (Applied Biosystem) segítségével és a primer- efficienciák figyelembevételével végeztük el. A Q-PCR eredmények expressziós szintjeinek relatív kvantifikáláshoz a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk, referencia pontnak pedig a 0. napot tekintettük. Eredményeink statisztikai analízisét egyváltozós ANOVA teszttel végeztük,

melyet Dunett Post Hoc analízis követett. Szignifikáns változásnak tekintettük azokat a mérési eredményeket melyeknél a $p \leq 0,05$ bizonyult.

3.3. Immunhisztokéimiai vizsgálatok

1. **Fixálás:** A szemserlegek eltávolítását követően, azokat 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk két órán keresztül szobahőmérsékleten, majd ezután 3x10 percig mostuk őket PBS-ben.
2. **Kriosztátos metszet készítése:** A fixált szemserlegeket 10-20-30%-os szacharóz oldatban telítettük, majd O.C.T médiumba (Prolabo) ágyasztuk be. Végül 12 μ m vastagságú metszeteket készítettünk belőlük kriosztát segítségével.

3. Immuncitokémia:

- a) A metszeteket 0,2 % Triton X-100 tartalmú 0,1 M foszfát puffer-0,9% NaCl oldatban (PBS) inkubáltuk 30 percig, hogy megnöveljük a metszetek permeabilitását.
- b) A nem specifikus kötőhelyek blokkolása érdekében a retina metszeteket 5 %-os normál szérum (NGS) és 1%-os borjú szérum albumin (BSA) tartalmú PBS-ben inkubáltuk 30 percig nedves kamrában.
- c) A metszeteket primer antitestben inkubáltuk egy éjszakán keresztül nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Vizsgálataink során egyszeres és kettős jelölést is végeztünk. A kísérleteinkhez használt primer antitestek listáját és jellemzőit a 5. táblázat tartalmazza.

Antigén	Hígítás	Gazdafaj	Gyártó
anti-PAC1	1:2000	nyúl	Pierce
anti-PKC	1:1000	egér	Sigma
anti-Calbindin	1:1000	egér	Sigma

5. táblázat: Primer antitestek és jellemzőik

- d) A le nem kötött primer antitesteket PBS-el mostuk ki a metszetekből (6x5 perc).
- e) A retina metszeteket fluoreszcens festékkel konjugált anti-egér-Alexa 568-at (1:500) (Life Technologies) és anti-egér-Alexa 484-et (1:500) (Life Technologies) tartalmazó oldatban inkubáltuk 4-6 órán keresztül szobahőmérsékleten.
- f) A metszeteket végül 6x5 percig mossuk PBS-ben, majd fedjük őket, amihez DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festéket tartalmazó Prolong-ot használtuk.
- g) Mintáinkat konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

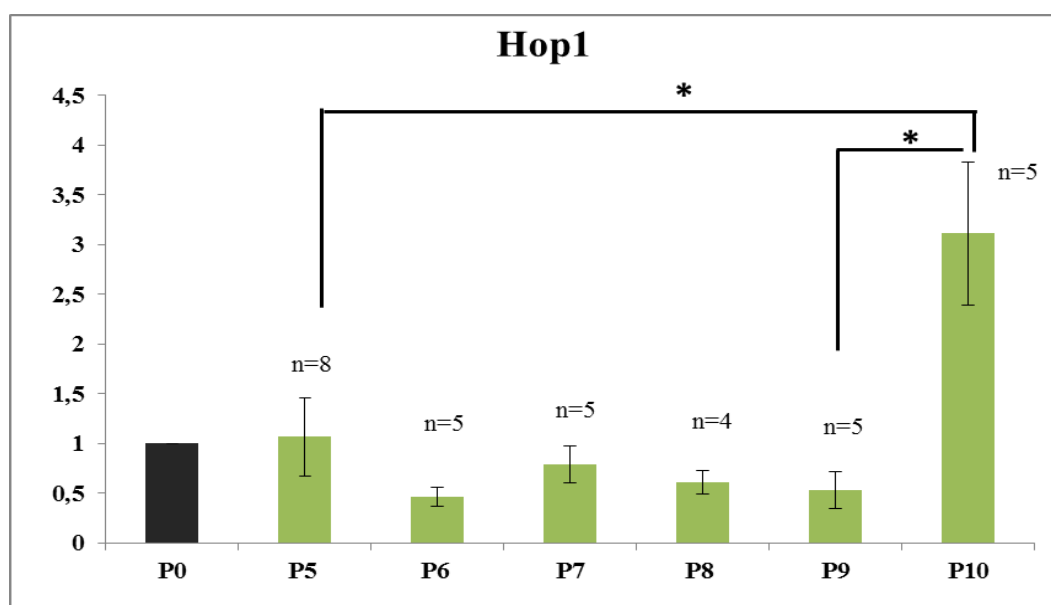
4.1. Hip és Hop1 receptorok expressziójának változásai

Kutató csoportunk korábbi eredményeire alapozva részletesebben megvizsgáltuk az általunk feltételezett Hip és Hop1 receptor izoforma-váltás időbeli lefutását fejlődő patkány retinában.

4.1.1. A Hip és Hop1 receptor izoformák expressziójának változása a retina fejlődése során

A kvantitatív real-time PCR eredményeink alapján meghatároztuk a Hip és a Hop1 splice variánsok önmagukhoz viszonyított expressziós mintázatát 5- 6- 7- 8- 9 és 10 napos patkány retinában. Referencia pontnak a 0. napon eltávolított retinát tekintettük és ehhez viszonyítottuk az egyes izoformák kifejeződésének mértékét.

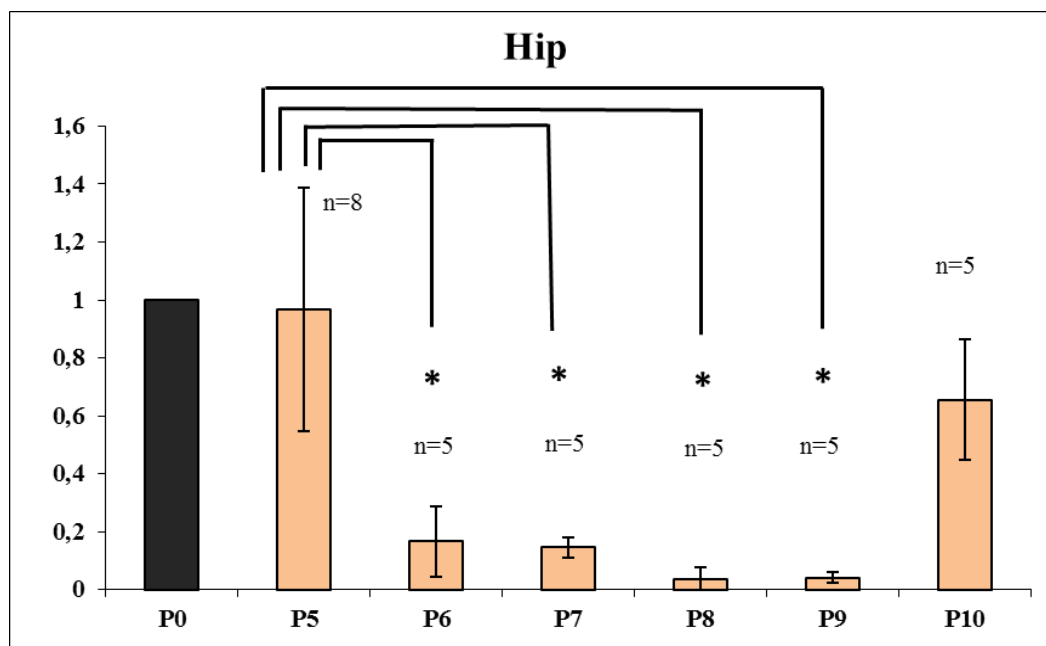
A Hop1 izoforma expressziójában egyedül a P10. napon tapasztaltunk szignifikáns változást. A P6. naptól kezdődően egy enyhe, statisztikailag nem szignifikáns átmeneti csökkenés ($0,46 \pm 0,19$) tapasztalható. Ezt követően P7 ($0,78 \pm 0,36$), P8 ($0,61 \pm 0,23$) korban az izoforma szintje tartósan alacsonyan marad egészen a P9. ($0,53 \pm 0,37$) napig. A P10. napon ($3,11 \pm 1,44$) azonban a Hop1 receptor izoforma expressziója ugrásszerűen megemelkedett (7. ábra).



7. ábra: Hop1 receptor izoforma expressziójának változása P5 és P10 között.

A Hip izoforma expressziójában az P6. napnál ($0,245 \pm 0,165$) egy statisztikailag szignifikáns drasztikus csökkenést tapasztaltunk, amelynek köszönhetően az izoforma

transzkripciója alig haladja meg a detektálhatóság szintjét. A P7. ($0,14 \pm 0,06$) és P8. ($0,037 \pm 0,074$) napokon szintje rendkívül kis mértékben megemelkedik, de a P9. ($0,04 \pm 0,03$) napra az expressziós változás szinte nem is mérhető ismét. Hasonlóan a Hop1 izoformánál tapasztaltaknál a P10. napra ($0,65 \pm 0,41$) expressziója kisebb emelkedést mutat, ott azonban ez a változás nem érte el a referencia gén szintjét sem (8. ábra).

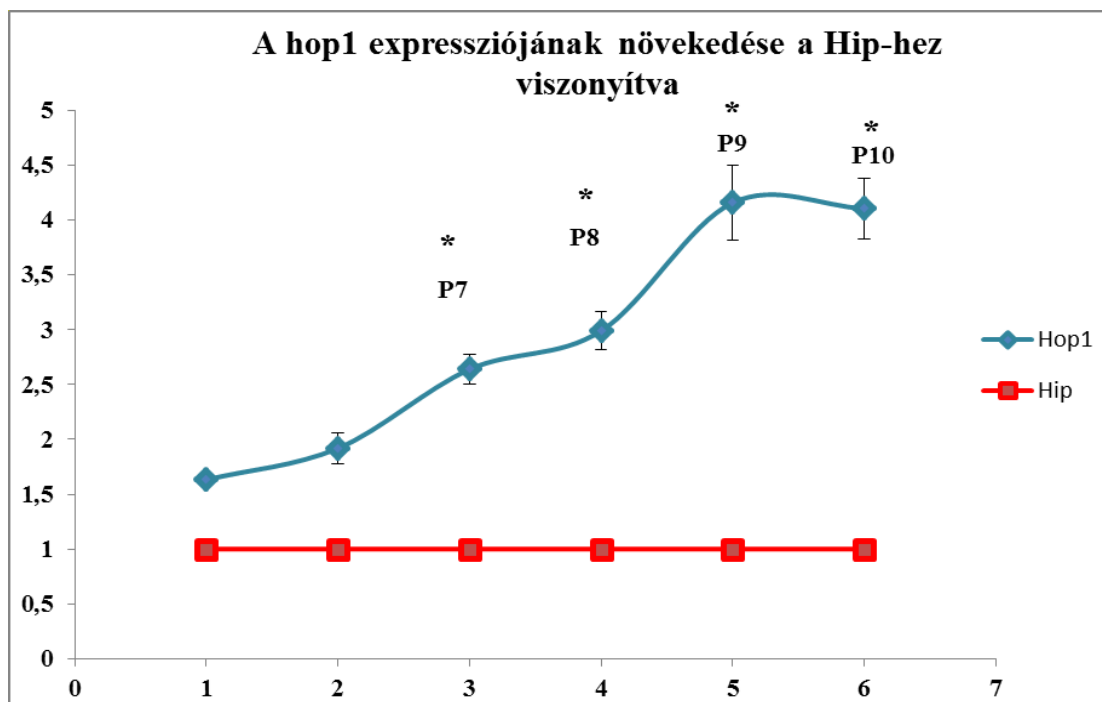


8. ábra: Hip receptor izoforma expressziójának változása a P5 és P10 között

4.1.2. A Hip és Hop1 izoformák egymáshoz viszonyított kifejeződésének vizsgálata

Vizsgálataink során arra is kerestük a választ, hogy a két receptor izoforma egy adott életkorban egymáshoz képest, hogyan fejeződik ki. Ezen az adatnak a birtokában tudtuk megállapítani a Hip/Hop1 izoforma-váltás pontos idejét és folyamatát. Ennek elvégzéséhez használtuk a festékkel jelölt izoforma specifikus próbákat.

Jelen esetben a Hop1 receptor kifejeződésének változását viszonyítottuk a Hip expressziójához. Tehát, a Hip receptort kezeltük refenciaként és ehhez képest ábrázoltuk a Hop1 expresszióját. A 9. ábrán jól látható, hogy a P5. és P6. napja között a Hop1 expressziója szignifikánsan nem változik a Hip-hez képest. Azonban a 7. napnál már szignifikáns eltérés ($2,63 \pm 0,34$) tapasztalható a Hop1receptor expressziójában. A további napokban a Hop receptor izoforma kifejeződésének mértéke 3-4 szerez, statisztikailag szignifikáns emelkedést mutatott a Hip expressziójához viszonyítva (9. ábra).



9. ábra: Hop1 receptor izoforma kifejeződése a Hip receptorhoz képest

4.2. PAC1-R immunreaktív struktúrák azonosítása

4.2.1. PAC1 immunreaktív struktúrák kimutatása a retinában

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a retina fejlődése során, (5-6-7-8-9 és 10 nap), mely struktúrák mutatnak PAC1 receptor (PAC1-R) immunpozitivitást. Kíváncsiak voltunk továbbá arra, hogy ugyanazon retinális elemek fejezik ki a PAC1 receptort vagy ezek változnak-e az idő előre haladtával?

Az 5 napos retina esetében jól látható a már kifejlődött pigment epitélium, külső magvas réteg, a fejlődő külső plexiform réteg, a belső magvas réteg, a belső plexiform réteg és a ganglion sejtek rétege (10/a. ábra). Ezek közül a struktúrák közül a pigment epitélium sejtjei, a belső magvas réteg sejtjei, a belső plexiform réteg rostjai és a ganglion sejtek mutatnak PAC1 receptor immunreaktivitást. Már az 5 napos retina metszeteken is jól megfigyelhető az INL felső rétegében, az ONL közvetlen közelében elhelyezkedő jellegzetes immunreaktív sejtpopuláció (10/a és a' ábra, nyilak).

A 6. napnál ugyanezen immunreaktív struktúrák figyelhetők meg, de láthatóvá válnak az INL proximális részén elhelyezkedő – feltételezhetően - amakrin sejtek is (10/b ábra, nyílhegyek). A legszembetűnőbb PAC1-R immunreaktivitást a GCL rétegben tapasztaltunk, ahol majdnem az összes sejt PAC1 immunpozitív volt (10/b és b' ábra, nyilak)

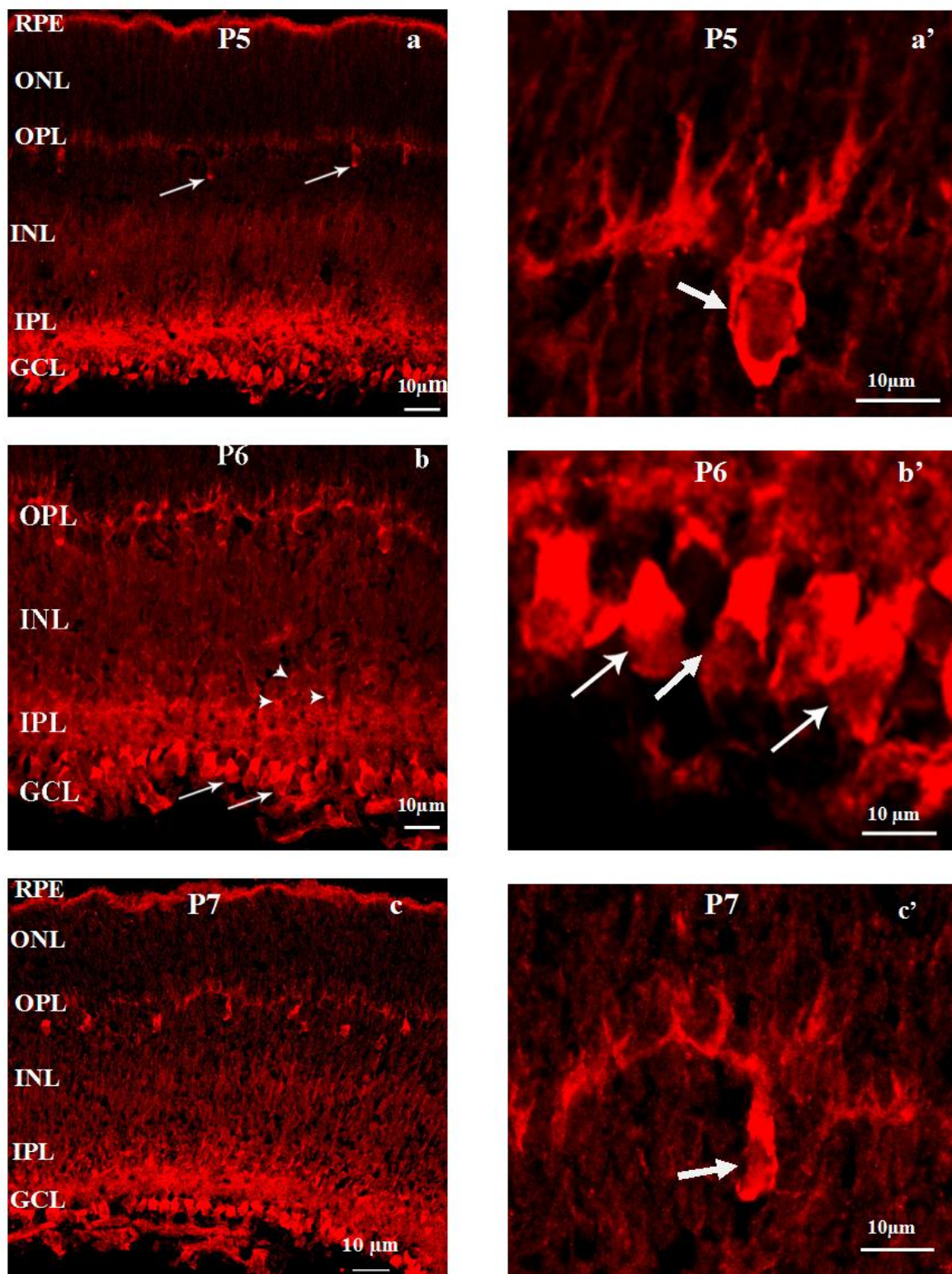
A 7. napnál új, PAC1-R immunreaktivitást mutató idegi elemet nem találtunk (10/c ábra), a GCL, INL jellegzetes sejtjeiben immunreaktivitás továbbra is detektálható (10/c' ábra, nyíl).

A 8. (11/a és a') és 9. napnál (11/b és b' ábra) egyre kifejezettebben látni PAC1-R-t expresszáló sejtek fejlődő nyúlványrendszerét (11/b' ábra, nyílhegyek).

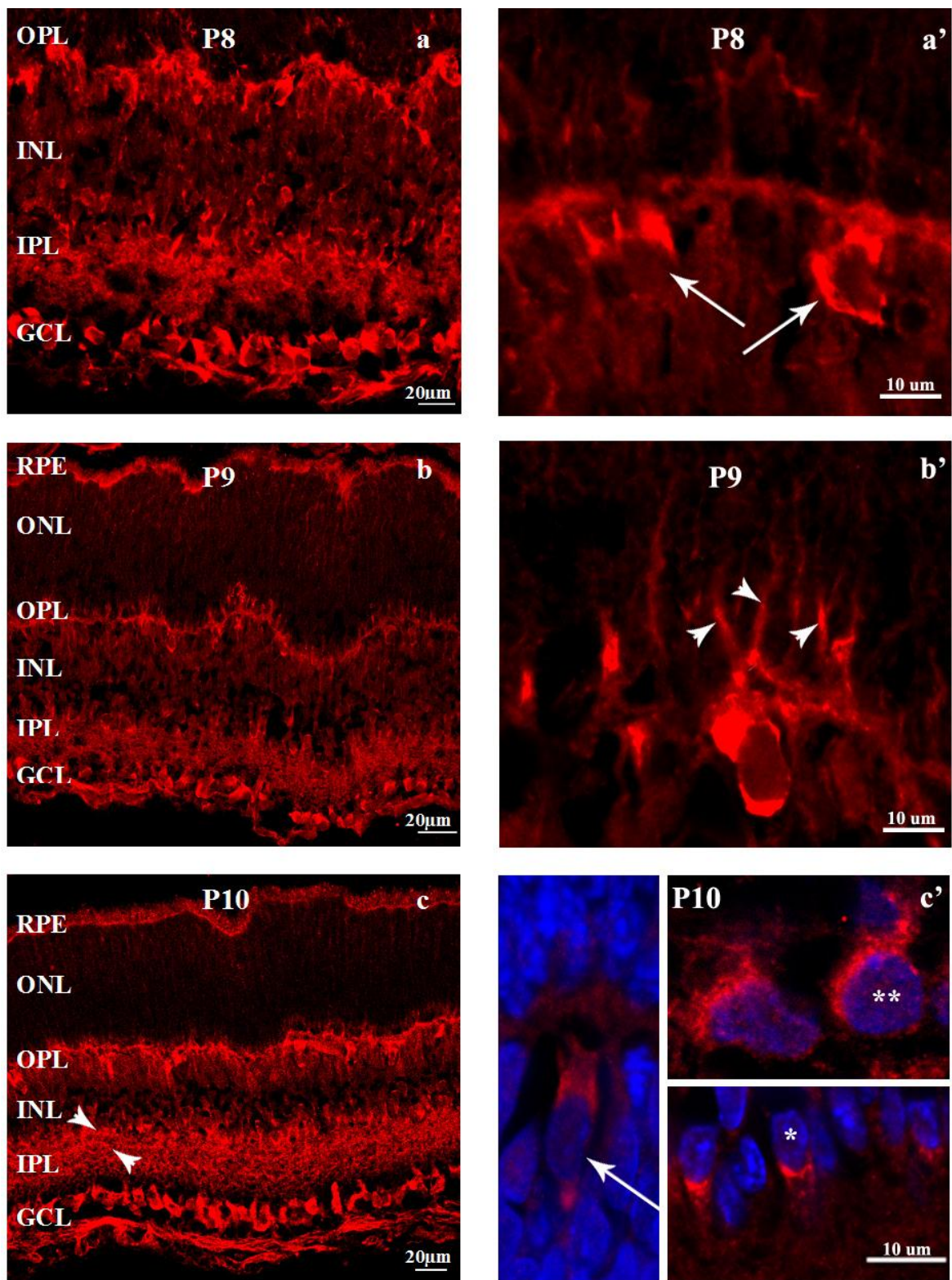
Posztnatális fejlődés 10. napján (11/c és c' ábra) az eddig megfigyelt PAC1-R immunreaktív struktúrák jelen vannak (RPE, INL sejtjei, IPL, GCL sejtjei), azonban az IPL-ben az immunpozitív rostok mennyisége határozottan növekszik, kirajzolva az IPL rétegeit (10/c, nyílhegyek). Ebben a fejlődési stádiumban is elmondható, hogy az INL felső részében lokalizálható sejtek (11/c' ábra, nyíl), a GCL-ben elhelyezkedő sejtek (11/c' ábra, kettős csillag), valamint az INL proximális részén detektálható sejtek (11/c' ábra, csillag) mutatnak PAC1-R immunreaktivitást. Ez utóbbi képeken a DAPI háttérfestés jelzi, hogy a PAC1-R immunreaktivitás nem detektálható a sejtmagokban, csak a citoplazmára és a sejtmembránra korlátozódik.

A metszeteken megfigyelhető, hogy az általunk vizsgált időintervallumban (P5-P10) ugyanazon struktúrák mutatnak PAC1-R immunreaktivitást, ez alól kivételt jelentenek az INL

alsó részén megjelenő immunreaktív sejtek, melyek immunreaktivitása, csak a posztnatális fejlődés 6. napjától éri el a detektálhatóság szintjét.



10. ábra: P5 (a-a')-P6 (b-b')-P7 (c-c') napos retinában detektálható PAC1-R immunreaktív struktúrák.

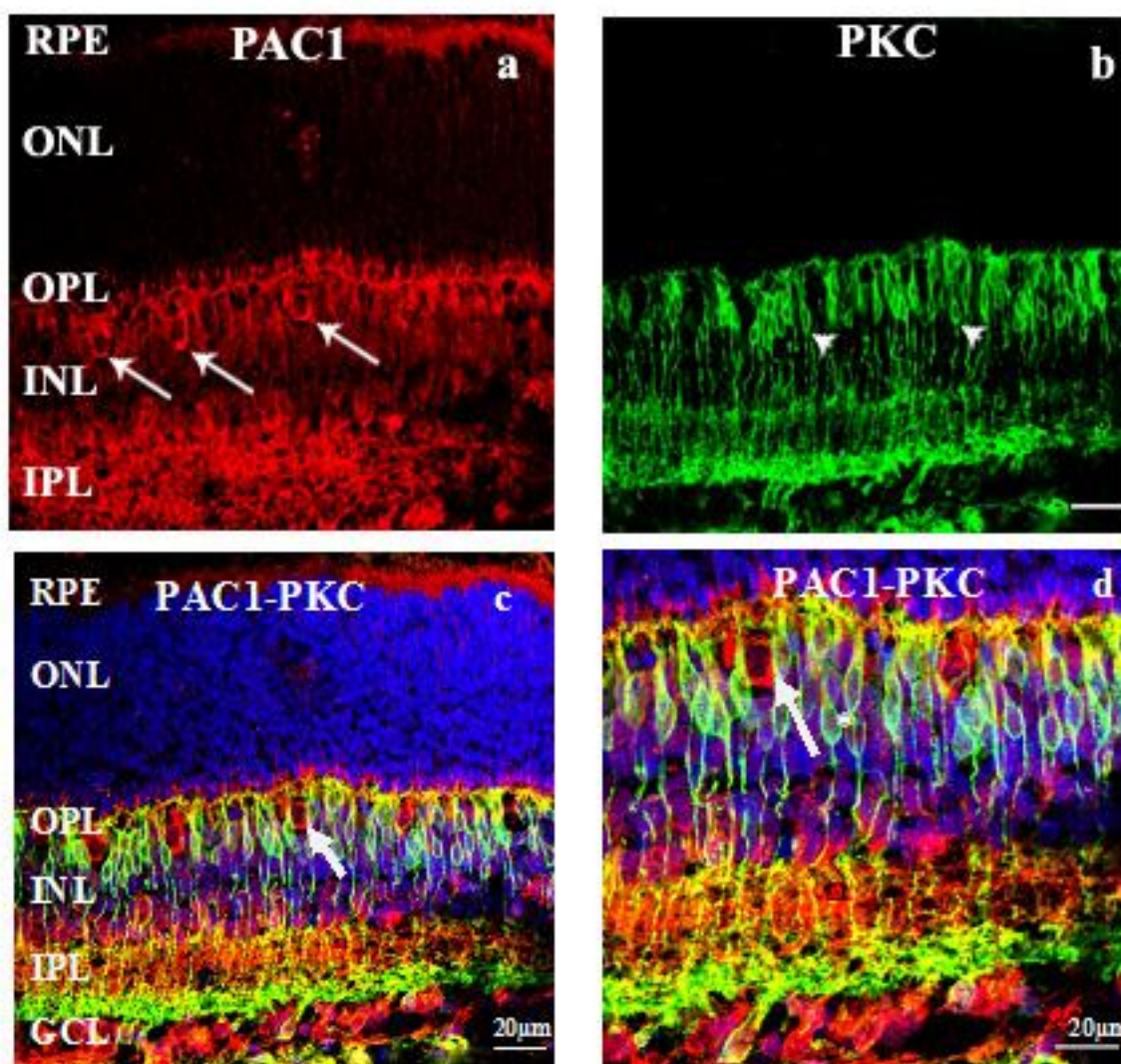


11. ábra. P8 (a-a')-P9 (b-b')-P10 (c-c') napos retinában detektálható PAC1-R immunreaktív struktúrák.

4.2.2. Kettős jelölés PAC1 immunpozitív sejtípus azonosításra

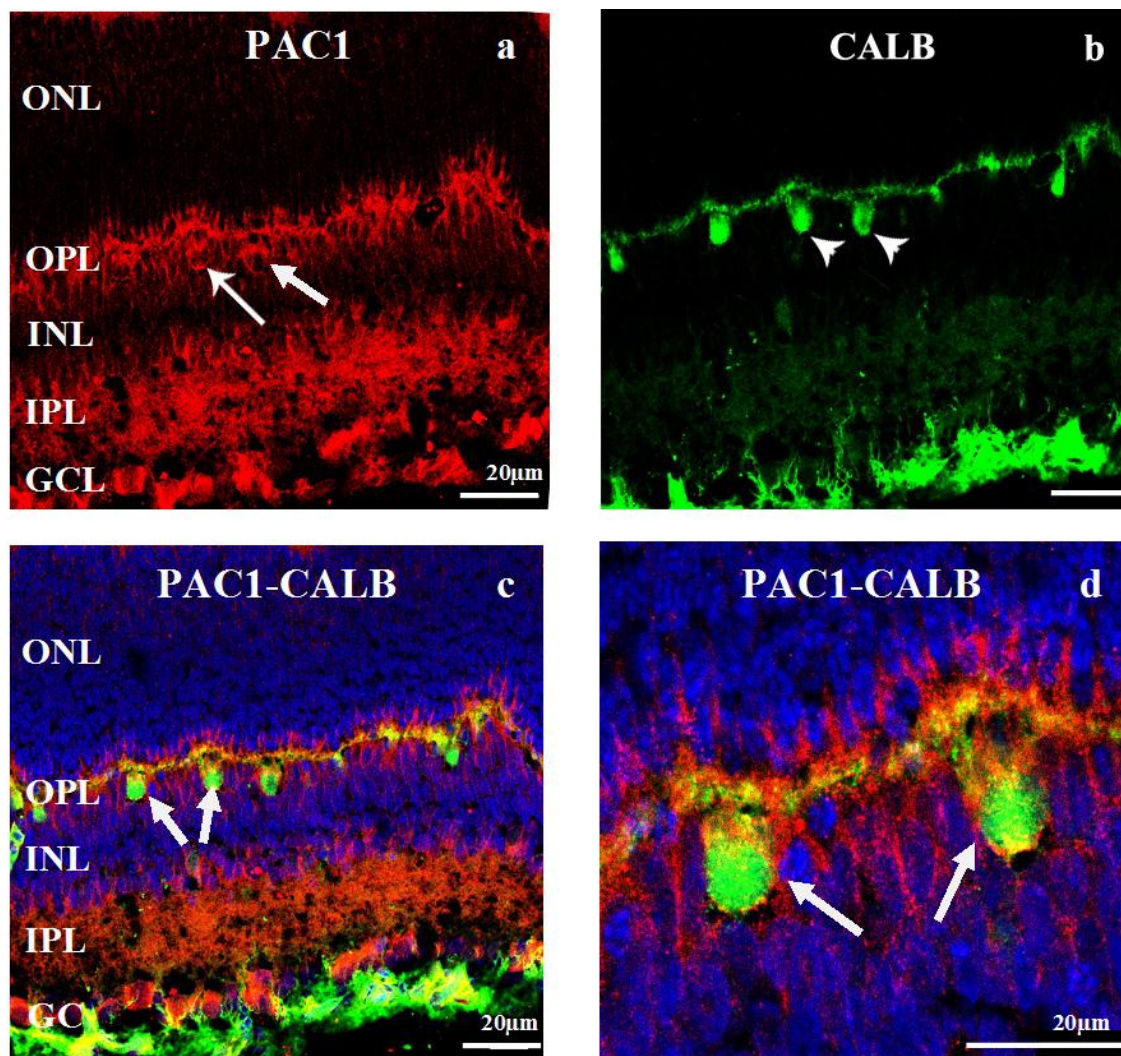
A PAC1 receptort kifejező struktúrák közül elsőként az INL felső rétegében elhelyezkedő sejtcsoportnak szenteltünk figyelmet, mely helyzetéből adódóan tartozhatnak a horizontális sejtek, bipoláris sejtek vagy Müller sejtek csoportjához. Ennek eldöntéséhez kettős immunjelöléseket végeztünk. A bipoláris sejtekre specifikus protein-kináz- C (PKC), illetve a horizontális sejtekre specifikus calbindin (CALB) ellenanyagot használtunk a 10 napos metszeteken.

A 12. ábra mutatja a vizsgált PAC1 immunreaktív sejtpopulációt (12/a, nyilak), a PKC-immunpozitív sejteket (12/b, nyílhegyek) és a két immunjelölés egyesített képét (12/c és d). Kolokalizációt a két immunjelölés között nem találtunk.



12. ábra: a: PAC1-R immunpozitív sejt, b: PKC pozitív bipoláris sejtek, c-d: kettős jelölés.

A 13. ábra a PAC1 receptor és calbindin antitesttel végzett immunjelölés eredménye látható. A PAC1 receptor immunreaktivitás (13/a ábra, nyilak) és a calbindin immunreaktivitás (12/d ábra, nyílhegyek) között teljes kolokalizáció figyelhető meg (13/c és d ábra, nyilak).



13. ábra: a: PAC1 pozitív sejtforma, b: calbindin pozitív horizontális sejt, c-d: kettős jeölés

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A PACAP rendkívül sokféle biológiai hatással rendelkezik a szervezetben. Serkentheti vagy éppen gátolhatja a sejtek osztódását és differenciálódását, valamint szerepet játszik az apoptotikus folyamatokban is (LU és mtsai., 1998, GONZALEZ és mtsai., 1997). A PACAP ezen rendkívül sokrétű hatása a szervezetben magyarázható egyrészt a peptid széles spektrumú előfordulásával, másrészt a különböző típusú PACAP receptorok jelenlétével, valamint ezen receptorok mögött feltételezhető különböző szignáltranszdukciós útvonalak aktiválódásával.

5.1. Izoforma-váltás lezajlása

A PACAP a retina ontogenezisében betöltött szerepére világít rá az a tény, hogy PAC1-R jelenlétét mutatták ki már az embrionális fejlődés 16. napján patkány retinában. A PAC1-R és PACAP expressziója folytatódik a születést követően egészen a kifejlett korig (NJAINE és mtsai., 2010). Korábban bebizonyították, hogy a patkány retinában a PAC1 receptor jelenléte a domináns (D'AGATA és CAVALLARO, 1997). A PAC1 receptor izoformáinak eddig 6 típusát azonosították patkányban, a Null, Hip, Hop1, Hop2, HipHop1 és HipHop2 izoformákat (DICKSON és FINLAYSON, 2009). További kutatások pedig igazolták, hogy a retinában ezen hat PAC1 receptor izoforma közül a Null, Hip, Hop1 és HipHop1 splice variánsok közvetítik a peptid hatását a posztnatális fejlődés során (LAKK és mtsai., 2012). A fejlődés alatt a retinában kimutatott négy PAC1 receptor izoforma expressziója dinamikus változást mutat. Ez a megállapítás azért is fontos, mert az egyes PAC 1 receptor izoformák a PACAP eltérő hatásait közvetítik, így a PACAP fejlődésben betöltött szerepe is változhat ennek következtében. Kutatócsoportunk egy korábbi munkája során amellet, hogy sikeresen azonosította a PAC1 receptor izoformák négy típusát megvizsgálták ezen splice variánsok expressziós arányának változását 0-1-3-5-10-15 és 20 napos patkány retinában. Ezekből az eredményekből egyértelműen látszik, hogy az egyes izoformák expressziója drámain változik a retina fejlődése során. Különösen szembetűnő a Hip és Hop1 variáns kifejeződésének változása a posztnatális időszak 5. és 10. napján. Ezen fejlődési időszakban feltételezhető, hogy a Hip izoforma addigi dominanciáját felváltja a Hop1 receptor izoforma és ez utóbbi splice variáns válik a domináns PAC1 receptorrá a retinában (LAKK és mtsai., 2012).

A PACAP receptorok és izoformáinak jelenlétét számos módon vizsgálták és leírták a központi idegrendszer különböző területein, azonban fejlődésben betöltött szerepükről ezeknek a receptoroknak a retina vonatkozásában keveset tudunk. Munkánk során kutatócsoportunk korábbi eredményeire alapozva megpróbáltuk feltérképezni a PAC1-R-ok eloszlását és expresszióját az emlős retina egy kritikus posztnatális fejlődési periódusában (P5-P10), mely fontos adatokat szolgáltathat későbbi funkcionális vizsgálatok számára. Eredményeink azt mutatják, hogy a Hip/Hop1 receptor csere a posztnatális 6. napon kezdődik és a 7. naptól már a Hop1 izoforma dominanciája érvényesül. Ugyanakkor vizsgálati eredményeink azt is mutatják, hogy a Hop1 receptor expressziója nem változik szignifikánsan ebben az időintervallumban, csak a 10. napon mutat egy jelentős emelkedést. Ezzel szemben a Hip mRNS szintje drasztikusan lecsökken. A két vizsgálat eredményének összevetése jól tükrözi számunkra, hogy a Hop1 expressziójában tapasztalható növekedést a Hip izoforma kifejeződésének csökkenése okozza.

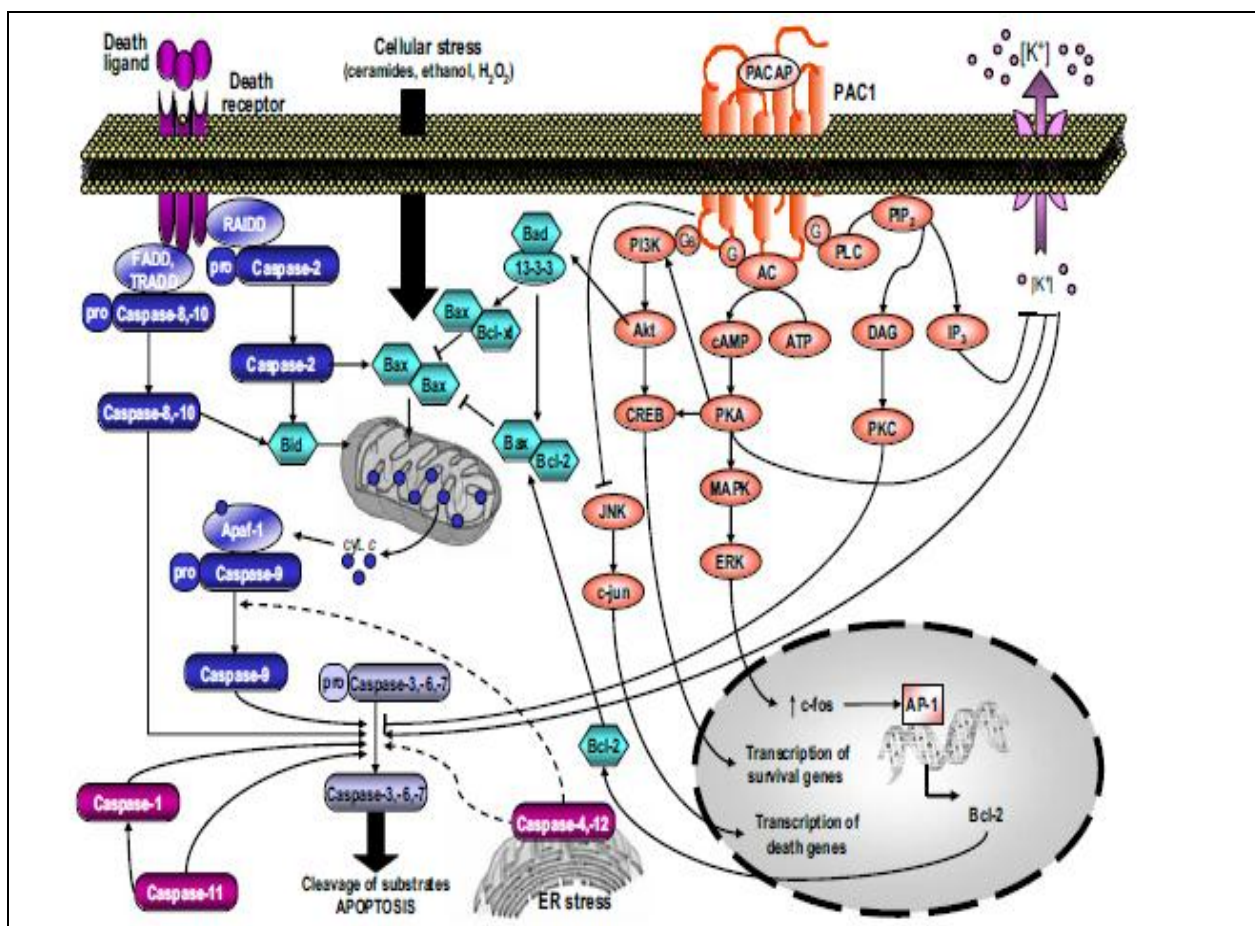
5.2. PAC1-R eloszlás időbeli jellegzetességei, valamint összehasonlítása egyéb neurokémiai eredményekkel

Anti-PAC-R antitesttel végzett immuncitokémiai jelölések azonosítottuk azokat a struktúrákat, melyek PAC1 receptort expresszálnak. Ez alapján megállapítható, hogy a posztnatális fejlődés 1-2. hetében a PACAP befolyásolhatja a ganglion sejtek, amakrin sejtek, horizontális sejtek és a pigment epithelium fejlődését. Az INL-ben található PAC1-R immunreaktív struktúrák közül a horizontális sejteket tudtuk egyértelműen azonosítani. A többi sejttípus azonosítása jövőbeni terveink között szerepel. A fejlődés ezen időszakában a retinában jelentős, fejlődést meghatározó folyamatok játszódnak le. Erre az időszakra tehető a neuritok kifejlődése, a szinapszisok képződése, ezek révén az IPL és OPL kialakulása. Az OPL kifejlődése P5 korban indul patkány retinában (WEBSTER és mtsai., 1991). Az első posztnatális héten az IPL-ben a neuritok kifejlődése, differenciálódása, valamint sejtek közötti szinaptogenezis eseményei a meghatározóak (JOHANSSON és mtsai., 2000). Ugyancsak erre a fejlődési periódusra tehető a konvencionális szinapszisok megjelenése. Ezek a szinapszisok még éretlenek ebben az időszakban, de a szinaptikus vezikulák jelenléte a praeszinaptikus membránban és a neurotranszmitter receptorok kifejeződése a posztszinaptikus oldalon azt mutatja, hogy már funkcióképesek (SASSOÉ-POGNETTO és WÄSSLE, 1997). A retina fejlődésével és a PAC1-R megjelenésével az egyes retinát felépítő sejttípusokban párhuzamosan zajlik a transzporterek és szinaptikus proteinek expressziója is a posztnatális

fejlődés 1- 2. hetében, például a vezikuláris glutamát transzporter 1- et (VGLUT) és a vezikuláris GABA/ glicin transzporter (VGAT) expresszióját posztnatális emlős retinában (JOHNSON és mtsai., 2003). Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a PACAP a PAC1 receptorokon keresztül szabályozza a GABAerg amakrin sejtek kialakulását is, amelyek képződése szintén erre a periódusra esik, valamint, hogy a megemelkedett PACAP szint az INL vastagságának csökkenését okozza (LANG és mtsai., 2009). A megemlített kutatási eredményekből jól látszik, hogy a retinális fejlődés 1.-2. hetében számos fejlődési folyamat játszódik le és ezek az események a PAC1 receptorok megjelenésével párhuzamosan zajlanak. Így feltételezhetjük, hogy a PACAP ezeket a fejlődési folyamatokat befolyásolja, de ennek bizonyítására további funkcionális vizsgálatok szükségesek.

5.3. A Hop1 és Hip receptorok mögött álló szignál transzdukciós útvonalak

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid széleskörű hatása egyértelműen receptorainak és a hozzájuk kapcsolódó szignál transzdukciós útvonalaknak köszönhető (14. ábra).



**14. ábra: A PACAP receptorhoz kapcsoló szignáltranszdukciós
útvonalak (DEJDA és mtsai., 2008)**

Valamennyi PAC1 receptor típusra jellemző a cAMP/PKA/MAPK útvonal, amely szabályozza az AC keresztül a cAMP termelődését, majd a PKA-hoz kapcsolódva fehérjefoszforilációs mechanizmusokat indít be és ennek révén közvetíti a ligandum hatását a sejtmagba. Az már bizonyított tény, hogy a Hip receptor mögött egyedül az AC szignál útvonal áll (HOLIGHAUS és mtsai., 2011), míg a Hop1 receptor variánsához az AC útvonalon kívül más transzdukciós útvonalak is kapcsolódnak. Ezek közül az egyik a PLC által közvetített hatás (MUSTAFA és mtsai., 2007). A PLC aktiválódásának hatására két másodlagos

messenger, diacilglicerin (DAG) és inozitol-trifoszfát (IP3) keletkezik és ezen a ponton kettéválik a szignalizáció. Az IP3 Ca^{2+} csatornákhöz kapcsolódva Ca^{2+} felszabadulást idéz elő, amely számos célfehérje aktivitását befolyásolja. A PLC másik terméke a DAG a proteinkináz-C (PKC) enzimet aktiválja, amely a szignált a sejtmagba közvetíti. A Hop1 splice variánshoz kapcsolódó harmadik lehetséges útvonal az Akt neurotrofikus út. A PACAP által stimulált Akt útvonalhoz köthető elsődleges hatás, hogy képes megvédeni a neuronokat az apoptózistól (MAY és mtsai., 2010).

A retina fejlődésének korai szakaszában (P0-P1) a Hip receptor izoforma a domináns (LAKK és mtsai., 2012), amely dominancia a jelen dolgozat eredményei szerint P5 korban már eltűnik. A Hop1 receptorhoz kapcsolódó több, különböző szignál transzdukciós útvonal és az általuk közvetített hatások ismeretében belátható, hogy az általuk leírt Hip/Hop1 receptor izoforma váltás funkcionális jelentőséggel bírhat a fejlődő patkány retinában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) mind a perifériás, mind a központi idegrendszerben széles körben előforduló és sokféle funkcióval rendelkező regulátor molekula. Habár a PACAP és receptorainak (PAC1, VPAC1, VPAC2) jelenlétét a központi idegrendszerben bizonyították, és vizsgálták, a PACAP receptorok lokalizációja és expressziójuk alakulása a fejlődés során kevésbé kutatott terület. A három fő receptor típus mellett, a PAC1 receptorból alternatív splicing-nak köszönhetően további izoformák jönnek létre (Null, Hip, Hop1, Hiphop1).

Kutatócsoportunk korábbi eredményei azt mutatják, hogy ezen izoformák expressziója jelentős változásokon megy keresztül a retina posztnatális fejlődése során. Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy egy Hip/Hop1 izoforma váltás játszódik le 5 és 10 nap között a fejlődő retinában. Kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy az izoforma váltás pontos idejét, lefutását meghatározzuk kvantitatív real-time PCR segítségével és immuncitokémiai módszerrel azonosítsuk a PAC1 receptort expresszáló struktúrákat a patkány retinában. Vizsgálati eredményeinket a következő pontokban foglalhatjuk össze:

- A posztnatális fejlődés 5. és 10. napja között a Hop1 receptor expressziója először változatlan, majd a 9. és 10. nap között ugrásszerű növekedése figyelhető meg.
- A Hip receptor expressziója olyan erőteljes csökkenést mutat a posztnatális fejlődés 6. napján, hogy a kérdéses izoforma transzkripciója alig detektálható.
- A 6. naptól megkezdődik a Hip/Hop1 izoforma-váltás, mely folyamat eredményeképpen a 7. naptól a Hop1 receptor válik a domináns PAC1 receptorrá a patkány retinában.
- PAC1 receptort a pigment epithelium sejtjei, a NBL, illetve INL sejtjei, és a ganglion sejtek expresszálnak.
- A PAC1-R immunreaktív sejtjei közül a horizontális sejtek immunreaktivitását bizonyítottuk egyértelműen kettős immunjelölések segítségével
- PAC1 immunreaktivitás jelentősen nem változik a vizsgált időszakban, ezért feltételezhetjük, hogy az Hip/Hop1 izoforma-váltás ugyanazon struktúrákon belül következik be

Tekintve, hogy a Hip és Hop1 receptor típusok más jelátviteli útvonalakat aktiválnak, feltételezhető, hogy a receptor váltásnak köszönhetően a PACAP hatása is megváltozik a vizsgált időszakban.

7. IRODALMI HIVÁTKOZÁSOK

ARIMURA A, SOMOGYVÁRI-VIGH A, MIYATA A, MIZUNO K, COY DH, KITADA C. (1991): Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testis. *Endocrinology*, **129**: 2787-2789.

BAGNOLI P., DAL MONTE M., CASINI G. (2003): Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol*, **18**: 1219-1242.

D'AGATA V., CAVALLARO S. (1997): Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. *Molecular Brain Research*, **54**: 161-164.

DEJDA A., JOLIVET V., BOURGAULT S., SEABORN T, FOURNIER A, VAUDRY H, VAUDRY D (2008): Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative disease. *J Mol. Neurosci.*, **36**: 26-37.

DICKSON L., FINLAYSON K. (2009): VPAC and PAC receptors: from ligands to function. *Pharmacol Ther*, **121**: 294-316.

DOHI K., MIZUSHIMA H., NAKAJO S., OHTAKI H., MATSUNAGA S., ARUGA T., SHIODA S. (2002): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regulatory Peptides*, **109**: 83-88.

FAHRENKRUG J., STENNSTRUP BR., HANNIBAL J., ALM P., OTTENSEN B. (1996): Role of PACAP in the female reproductive organs. *Ann NY Acad. Sci.*, **805**: 394-407.

GONZALEZ BJ., BASILLE M., VAUDRY D., FOURNIER A., VAUDRY H. (1997): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblast. *Neuroscience*, **78**: 419-430.

HOLIGHAUS Y., MUSTAFA T., EIDEN LEE. (2011): PAC1hop, null and hip receptors mediate differential signaling through cyclic AMP and calcium leading to splice variant-specific gene induction in neural cells. *Peptides*, **32**: 26-34.

JOHANSSON K., BRUUN A., DE VENTE J., EHINGER B. (2000): Immunohistochemical Analysis of the Developing Inner Plexiform Layer in Postnatal Rat Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **41**: 305-313.

- JOHNSON J., TIAN N., CAYWOD MS., REIMER RJ., EDWARDS RH., COPENHAGEN DR. (2003): Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *J Neurosci.*, **23**: 518-529.
- KWONG K. M. J., LAM T. TIM (2000): N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Induced Apoptosis in Adult Rabbit Retinas. *Eye res.*, **71**: 437- 444.
- LAKK M., SZABÓ B., VÖLGYI B., GÁBRIEL R., DÉNES V. (2012): Development-Related Regulates Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptid (PACAP) Receptors int he Retina. *Invest Ophtalmol Vis Sci*, **53**:000-000.
- LANG B., ZHAO L., MCKIE L., FORRESTER JV., MCCAIG C. (2010): GABAergic amacrine cells and visual function are reduced in PAC1 transgenic mice. *Neuropharmacology*, **58**:02145-225.
- LU N., ZHOU R., DICICCO-BLOOM E. (1998): Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor. *J Neurosc Res.*, **53**: 651-662.
- MAY V., LUTZ E., MACKENZIE C., SCHUTZ KC., DOZARK K., BRAAS MK. (2010): Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptid (PACAP)/PAC1HOP1 Receptor Activation Coordinates Multiple Neorotrophic Signaling Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, **13**: 9749-9761.
- MIYATA A., ARIMURA A., DAHL R. R., MINAMINO N., UEHARA A., JIANG L., CULLER M.D., COY D. H. (1989): Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase int he pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **164**: 567-574.
- MORROW, E.M., CHEN, C.M., AND CEPKO, C.L. (2008). Temporal order of bipolar cell genesis in the neural retina. *Neural development*, **3**: 2.
- MUSTAFA T., GRIMALDI M., EIDEN LEE. (2010): The Hop Casette of the PAC1 Receptor Confers Coupling to Ca²⁺ Elevation Required for Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polipeptide-evoked Neurosecretion. *The Journal of Biological Chemistry*, **11**: 8079-8091.
- NJAINE B., MARTINS RA., SANTIAGO MF., LINDEN R., SILVEIRA MS. (2010): Pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide controls the proliferation of retinal progenitor cells through downregulation of cyclin D1. *Eur J Neurosci.*, **32**: 311-321.

PERRY V.H., HENDERSON Z., LINDEN R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *The Journal of comparative neurology*, **219**: 356-368.

RAPAPORT D.H., WONG L.L., WOOD E.D., YASUMURA D., AND LAVAIL M.M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *The Journal of comparative neurology*, **474**: 304-324.

REESE B.E., COLELLO, R.J. (1992). Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience*, **46**: 419-429.

SASSOE-POGNETTO M., WASSLE H. (1997): Synaptogenesis in the rat retina: subcellular localization of glycine receptors, GABA (A) receptors, and the anchoring protein gephyrin. *J Comp Neurol.*, **381**: 158-174.

SHERWOOD M. N., KRUECKL L. S., MCRORY E. J. (2000): The origin and function of the pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Review* **21** (6): 619- 670.

SILVEIRA S. M., COSTA R. M., BOZZA M., LINDER R. (2002): Pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cycling AMP- dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 16075-16080.

TAMÁS A., GÁBRIEL R., RÁCZ B. DÉNES V., KISS P., LUBICS A., LENDVÁRI I., REGLÓDI D. (2004) : Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium- glutamate. *Neuroscience Letters*, **372**: 110- 113.

VAUDRY D., GONZALEZ J. G., BASILLE M., YON L., FOURNIER A., VAUDRY H. (2000): Pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide and its receptors: from Structure to functions. *Pharmacological Reviews*, **52**: 269-324.

VAUDRY D. FALLUEL-MOREL A., BOURGAULT S., BASILLE M., BUREL D., WURTZ O., FOURNIER A., CHOW B., HASHIMOTO H., GALAS L., VAUDRY H (2009): Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev.*, **61**:283-357.

VINCZE É., KÖVES K. (2001): A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésben. *Orvosi Hetilap*, **14**: 491-496.

WEBSTER MJ., ROWE MH. (1991): Disruption of Developmental Timing in the albino rat retina. *J Comp Neurol*, **307**: 460-474.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Intézet valamennyi dolgozójának a kedvességét és segítőkészségét.

Külön szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Dénes Viktóriának és Dr. Gáriel Róbertnek, valamint Lakk Mónikának és Gödri Zoltánnak, hogy támogatták és segítették tudományos munkámat.

Továbbá köszönöm a segítségét Dr. Fekete Csabának és Dr. Berta Gergelynek (PTE, ÁOK), hogy szakmai tudásukkal támogatták munkámat.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Czotter Nikoletta a dolgozatomban leírt munkafolyamatok közül a:

- a szövet preparálást,
- RNS kivonást,
- RNS koncentráció meghatározását,
- reverz transzkripciót,
- kvantitatív Real-Time PCR reakciókat: SybrGreen módszer és Taqman módszer,
- adatok kiértékelését,
- hisztológiai procedúrákat,
- immuncitokémiai vizsgálatokat

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2012 december 07.